

図1. 成熟B細胞の分化のスキーム

【結果】

免疫グロブリン産生

成人ならびに臍帯血cB1 (ナイーブB細胞) は、SAC+IL-2+IL-10+CD40 刺激によって、メモリーB細胞と同様に大量のIgGとIgMを産生したが、IgA産生はみられなかった。TGFβ刺激によって、メモリーB細胞による各種刺激下のIgAは抑制された。また、TGFβ刺激によってcB1からIgA産生は誘導されなかった(図2)。

Mature $\gamma 1$, $\gamma 2$, AID mRNAの誘導

cB1とメモリーB細胞は、静止期においてgermline $\gamma 1$, $\gamma 2$ mRNAを発現していたが、cB1は静止期において、mature $\gamma 1$, $\gamma 2$ mRNAを発現せず、刺激によって発現を認めた(図3)。AID mRNAは、刺激によってその発現を認めた(図4)。複数の実験では、静止期メモリーB細胞からAID mRNA発現が認められた。以上から、cB1は、クラススイッチを起こしていないものの、刺激によってAIDを発現、引き続きクラススイッチが誘導されることが判明した。

Somatic hypermutation

Somatic hypermutationは、cB1に認めず、メモリーB細胞に認められるが、cB1からsomatic hypermutationの誘導を試みた。Immunoglobulin receptorやCD40刺激によって、cB1からCD27分子の発現を誘導できた。しかし、somatic hypermutationは、CD27陽性B細胞においても全くみられなかった(図5)。

形質細胞への誘導と形質細胞におけるsomatic hypermutation

cB1は、SAC+IL-2やIL-10+CD40/CD32Tによって軽度であるが、形質細胞へ誘導できた。SAC+IL-2+IL-10+CD40刺激によって、さらに強い形質細胞への誘導が認められた(図6)。

誘導されたCD38強陽性の細胞は形態的に形質細胞であった(図7A)。誘導された形質細胞を精製しsomatic hypermutationを検討したが、この系によって誘導された形質細胞は、somatic hypermutationを起こしていなかった(図7B)。

以上から、cB1から産生された免疫グロブリンは低親和性の抗体であると考えられた。

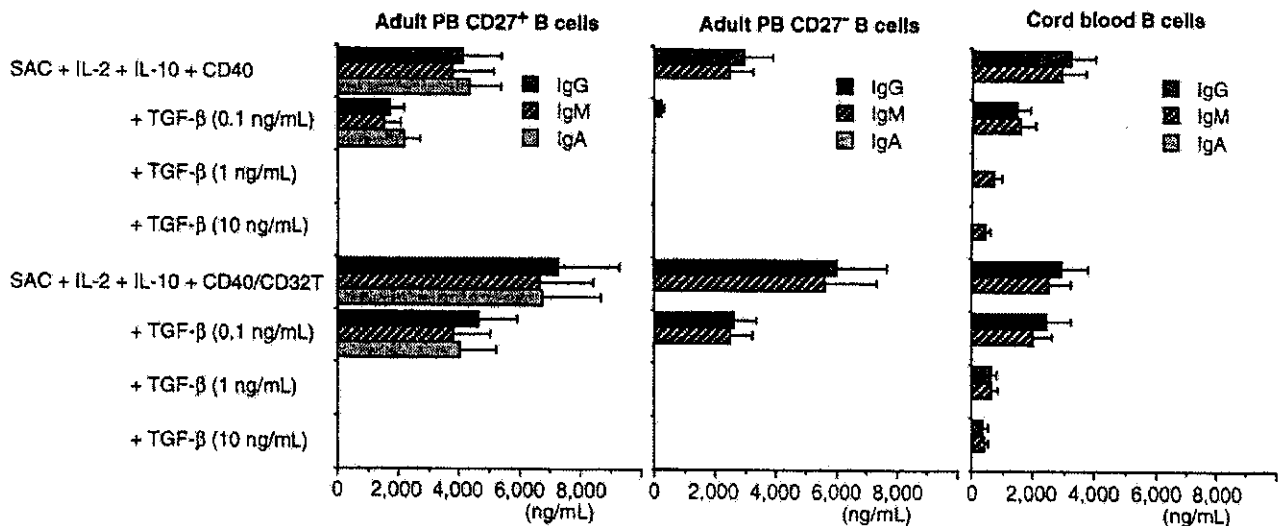


図2. 各B細胞分画の免疫グロブリン産生とTGFβの影響

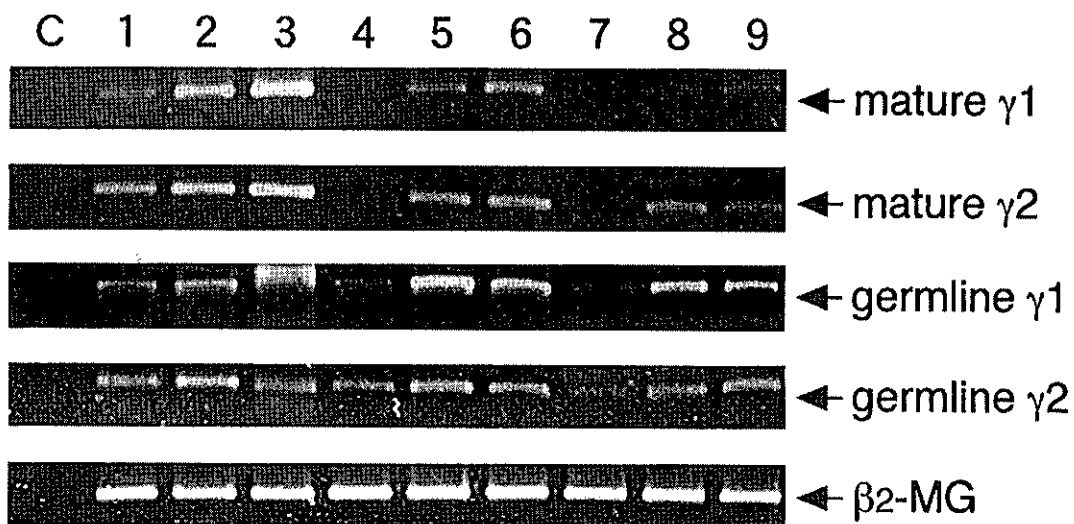


図3. Germline γ1, γ2およびmature γ1, γ2のmRNA発現。

1-3: メモリーB細胞, 4-6: cB1, 5-6: 臍帯血B細胞. 1,4,7: 無刺激, 2,5,8: SAC+IL-2+IL-10+CD40/CD32T (day 1), 3,6,9: (day4).

【考案】

末梢血B細胞をIgDとCD27の発現によって、3分画に分類することによって、B細胞機能解析ならびに種々の疾患における病態解析が飛躍的に進んだ。いままで真のナイーブB細胞は同定されていなかったため、ナイーブB細胞の解析は充分になされていなかった。IgD⁺IgM⁺CD27⁺B細胞がナイーブB細胞であることが判明しており(1)、成人および臍帯血からナイーブB細胞を精製しその機能解析を今回の研究で行った。

免疫グロブリンレセプターを刺激すると考えられるSACとCD40刺激を加え、さらにサイトカイン、IL-2とIL-10で刺激することによって、ナイーブB細胞もIgGとIgMを産生する。しかし、IgA産生はみられず、IgA産生が報告されているTGFβ刺激でも産生は起きなかった。おそらくIgAのクラススイッチはin vitroにおいてこれらの刺激では、cB1から起きないものと思われる。cB1からIgG産生を誘導できるということは、クラススイッチが起きていることに他ならない。RT-PCRでは、matureな

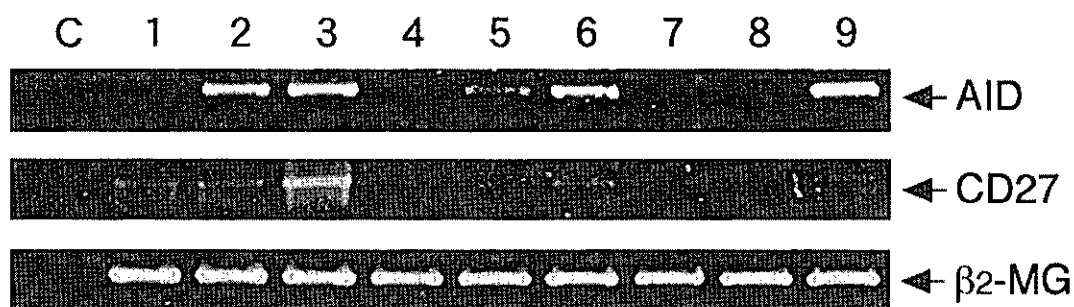


図4. AID mRNA発現.

1-3: メモリーB細胞, 4-6: cB1, 5-6: 臍帯血B細胞. 1,4,7: 無刺激, 2, 5, 8: SAC+IL-2+IL-10+CD40/CD32T (day 1), 3, 6, 9: (day4).

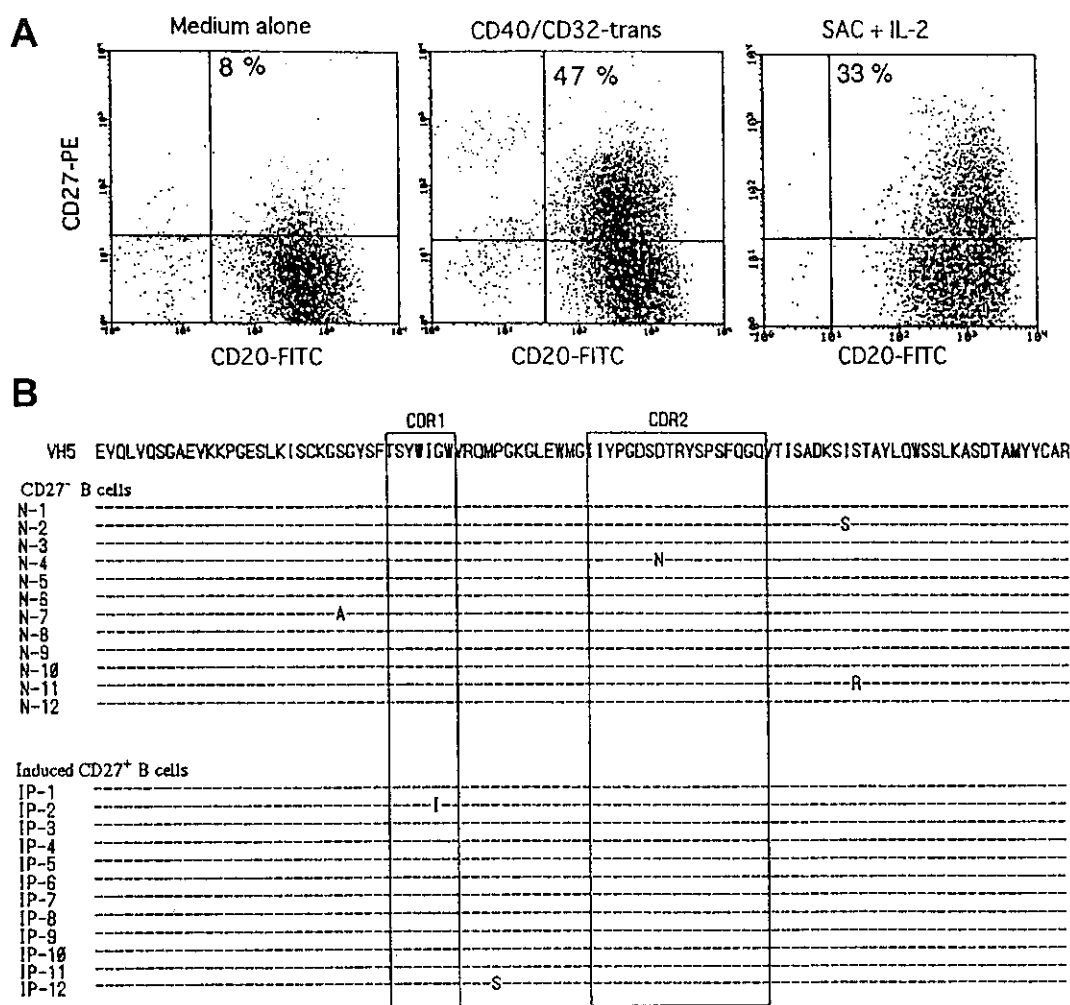


図5. 成人CD27陰性B細胞(ナイーブB細胞, cB1)をCD40/CD32-transfectantsやSAC+IL-2で刺激した(A)。cB1と同様に(上段)CD40/CD32-transfectants刺激によって誘導されたCD27陽性B細胞には, somatic hypermutationはみられなかった(B)。

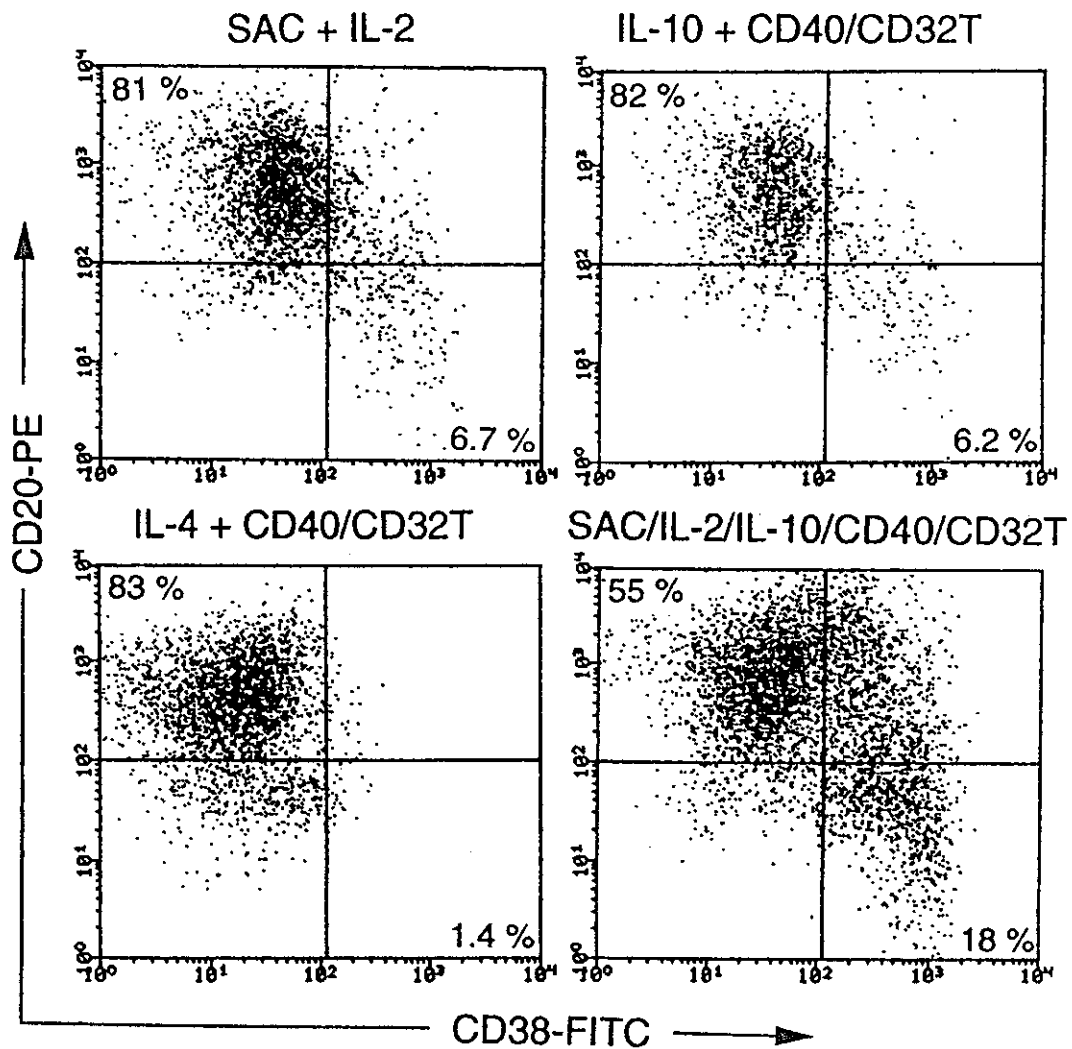


図6. CB1 から形質細胞へに誘導

mRNAが検出されたので、明らかにクラススイッチは誘導できるものと考えられる。AIDの発現はクラススイッチに不可欠と考えられている。刺激によってcB1はAID mRNAを発現するので、AID発現、そしてクラススイッチが生じていくものと考えられる。

ではメモリーB細胞はcB1から誘導できるのだろうか。cB1から刺激によってCD27発現を誘導できるものの、somatic hypermutationは生じていなかった。cB1は形質細胞に誘導されたが、その形質細胞はsomatic hypermutationを起こしていなかった。somatic hypermutationの誘導には、胚中心における新たな刺激、シグナル伝達が不可欠と思われる。

ナイーブB細胞は、クラススイッチを起こした

後に形質細胞に分化し、IgGなどを産生する。しかし、somatic hypermutationは誘導できないことから、低親和性の抗体と思われる。以上の所見から、somatic hypermutationとクラススイッチは別々の過程で起こり、胚中心を通らずに低親和性の抗体を産生する系が存在する可能性が示唆された。

【文献】

1. Agematsu K., Hokibara S., Nagumo H., Komiyama A. CD27: a memory B-cell marker. *Immunology Today* 21:204-206, 2000.
2. Agematsu K., H. Nagumo, F. C. Yang, T. Nakazawa, K. Fukushima, S. Ito, K. Sugita, T. Mori, T. Kobata, C. Morimoto, A. Komiyama. B cell subpopulations separated by CD27 and crucial collaboration of CD27+

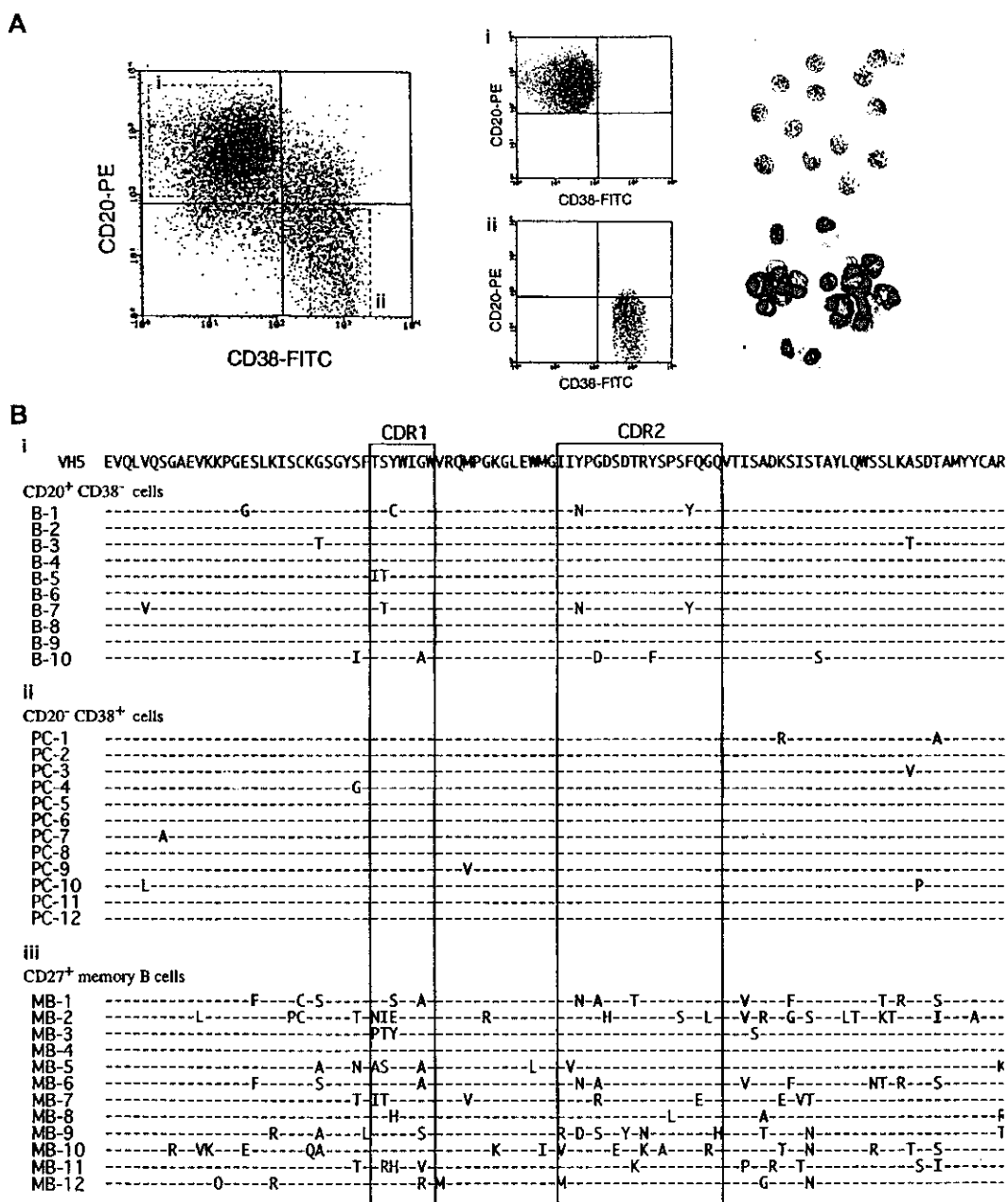


図7. cB1から形質細胞への誘導と形質細胞におけるsomatic hypermutationの検討

- B cell and helper T cell in the immunoglobulin production. *Eur. J. Immunol.* 27; 2073-2079, 1997.
- Agematsu K., H. Nagumo, K. Shinozaki, S. Hokibara, K. Yasui, K. Terada, N. Kawamura, T. Toba, S. Nonoyama, H. D. Ochs, A. Komiyama. Absence of IgD-CD27+ memory B cell population in X-linked hyper IgM syndrome. *J. Clin. Invest.* 102: 853-860, 1998.
 - Agematsu K, Futatani T, Hokibara S, Kobayashi H, Takamoto M, Tsukada S, Suzuki H, Koyasu S, Miyawaki T, Sugane K, Komiyama A and Ochs HD. Absence of memory B cells in patients with common variable immunodeficiency. *Clinical Immunology*. in press.
 - Nagumo H, Agematsu K, Kobayashi N, Shinozaki S, Hokibara S, Nagase H, Takamoto M, Yasui K, Sugane S, and Komiyama A. Different process of class switching and somatic hypermutation; a novel analysis by CD27- naive B cells. *Blood* 15:567-575, 2002.

Different process of class switching and somatic hypermutation; a novel analysis by CD27⁻ naive B cells

Kazunaga Agematsu^{1,2}, Haruo Nagumo², Norimoto Kobayashi², Takashi Yamazaki², Shinji Yamada², Satoshi Yamazaki², Shi Yuki¹, Masashi Nagase¹, Masaya Takamoto¹, Kazuo Sugane¹, Atsushi Komiyama²
Department of Infectious Immunology¹ and Pediatrics², Graduate School of Medicine, Shinshu University.

The relationship between class switch recombination (CSR) and somatic hypermutation has been unclear. By using human CD27⁻ naive B cells, we investigated the somatic hypermutation and producibility of immunoglobulins (Igs) which occur after CSR. Although neither adult CD27⁻ nor cord blood (CB) B cells, which showed the unmutated Ig V-region genes, produced IgG, IgM or IgA in response to conventional stimuli, they produced IgG, IgM, but not IgA in the presence of *Staphylococcus aureus* Cowan strain (SAC) + IL-2 + IL-10 + anti-CD40 mAb + CD32-transfectants (CD40/CD32T). The naive B cells also produced IgE when combined with IL-4 + CD40/CD32T. In parallel with IgG production, the expression of mature $\gamma 1$ and $\gamma 2$ transcripts were induced from naive B cells by the stimuli. The CD27 expression on human naive B cells was induced remarkably by CD40 signaling or B-cell receptor (BCR) engagement, but somatic hypermutation could not be induced. The proliferation and differentiation into plasma cells were induced from naive B cells, whereas most of the plasma cells displayed very low levels of mutations in Ig V-region genes. CD27⁻ naive B cells expressed activation-induced cytidine deaminase (AID) mRNA by the stimuli later than CD27⁺ memory B cells. Our results demonstrate that CSR, but not noticeable somatic hypermutation, can be induced from CD27⁻ naive B cells upon BCR engagement and CD40 signaling in cooperation with cytokines, suggesting that CSR and somatic hypermutation processes can occur independently, and the antibodies produced in this in vitro system are low-affinity antibodies.

原発性免疫不全症における変異タンパク質の分解機構の解析

松田 達志 (慶應義塾大学医学部微生物学免疫学教室)

小安 重夫 (慶應義塾大学医学部微生物学免疫学教室)

我々は、京都大学の片村らと共にCD8欠損症患者に見出された変異ZAP-70タンパク質の解析を行い、これまでに例のない二つの温度感受性変異 (P80Q変異ならびにM572L変異) を明らかにしてきた。これら変異タンパク質の分解は、制限温度下における高次構造の変化によってもたらされることが示唆された。変異ZAP-70タンパク質の分解は各種プロテアーゼ阻害剤を共存させても抑制されなかったことから、新規のプロテアーゼによって担われていることが示唆された。さらに変異ZAP-70タンパク質に特異的に結合する因子の存在が明らかとなった。

【はじめに】

我々は、京都大学の片村らと共に、京都大学病院小児科において見出されたCD8欠損症患者の末梢血T細胞を材料に、その変異の同定ならびに変異タンパク質の性状の解析を行った¹⁻³⁾。その結果、これまでに報告の無い新規のミスセンス変異が患者の2つのzap-70遺伝子座にそれぞれ生じていることを見出した。興味深いことに、我々の見出した変異 (P80Q変異ならびにM572L変異) は、共に哺乳類ではほとんど報告例の無い温度感受性変異であることが明らかとなった。すなわち、どちらのミスセンス変異を導入した場合もZAP-70タンパク質がきわめて不安定になり、33℃までは安定に存在しうるが、それ以上の温度では速やかに分解されることが分かった。この変異ZAP-70タンパク質の分解機構を明らかにすべく各種の解析を行った。

【対象と方法】

C末端側にMyc-tagを付加した野生型ヒトzap-70遺伝子のcDNAを鋳型に、各種変異体をPCR法によって作製した。野生型ならびにP80Q変異体に関しては、内在性のZAP-70を欠損したJurkat細胞株であるP116に遺伝子導入することで安定発現株を

得た。

【結果と考察】

M572L変異は、高等動物のチロシンキナーゼにおいて完全に保存されたキナーゼサブドメインXIに位置するメチオニンがロイシンに変異したものである。ZAP-70タンパク質の安定性に、メチオニン残基の存在が必須であるかどうかを検証するために各種の変異体を作製した。得られた変異体をJurkat細胞に一過性に発現させた後、immunoblot法によって発現レベルを比較した (図1)。温度感受性変異であるM572Lの発現が全く見られないのに対し、メチオニンをアラニンに置換した変異体M572Aにおいては若干の発現が、またイソロイシンに置換したM572I変異体では野生型とほぼ同程度の発現が認められた。それに対し、スレオニン

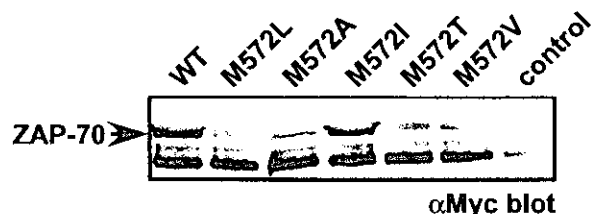


図1: キナーゼサブドメインXIの各種変異体の安定性

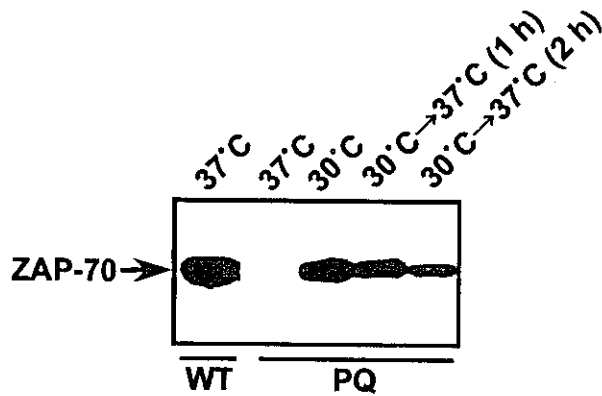


図 2：P80Q変異体の分解機構

やバリンへの変異体 (M572TならびにM572V) においては、M572Lと同様ほとんど発現が認められなかった。予備的な解析から、M572I変異体は野生型と同程度のキナーゼ活性を持っていることが示唆され、キナーゼサブドメインXIにおけるメチオニンの存在は、少なくともイソロイシンによって代替しうることが明らかとなった。さらに、作製した変異体の中で温度感受性を示したのはM572L変異体のみであり、ロイシンへの変異が微妙な構造変化を引き起こしていることが示唆された。

M572LやP80Qに見られる温度感受性が、タンパク質のfoldingに際した異常に起因するものなのか、高次構造の変化に起因するものなのかを明らかにするために、以下の実験を行った。内在性のZAP-70を欠損するJurkat細胞株P116に野生型もしくはP80Q変異体のcDNAをそれぞれ遺伝子導入し安定発現株を得た。得られたP116-P80Qにおいては、予想通り温度感受性にZAP-70の発現が認められた(図2)。もし、37°CにおけるP80Q変異体の発現の低下がfoldingに起因するものであれば、いったん30°Cで合成された変異体は37°Cに温度を上げても分解されないはずである。しかし、結果は37°Cに温度を上昇させることで速やかな分解が観察された。すなわち、少なくともP80Q変異体の示す温度感受性は、37°Cにおける変異体タンパク質の構造変化によるものであることが強く示唆された。

次に、我々はこれら変異体タンパク質の分解が細胞内の特殊な小器官で担われているのか否かを検討した。COS7細胞に野生型ならびにP80Q変異

Ca²⁺-dependent proteases BAPTA-AM	Lysosomal proteases NH ₄ Cl
Caspases z-VAD	Proteasome lactacystin MG115 MG132
Cathepsins and Thiol proteases pepstatin A leupeptin E64d	Tripeptidyl Peptidase II AAF-CMK
Chymotrypsin-like proteases chymostatin TPCK	Trypsin-like proteases TLCK

Table 1：各種 protease 阻害剤。変異ZAP-70タンパク質の分解は、これら阻害剤によっては抑制されなかった。

体の発現ベクターを遺伝子導入し、30°Cでincubateした後に37°Cに上昇させた。その際のZAP-70タンパク質の局在を抗ZAP-70抗体を用いた間接蛍光抗体法で調べたところ、分解されつつあるP80Q変異体も野生型と全く同様な局在を示すことが明らかとなった(図3)。すなわち、P80Q変異体は細胞内の小器官に輸送されて分解を受けるわけではなく、その場で分解を受けていることが示唆された。実際、各種のプロテアーゼ阻害剤を用いた解析からは、リソソーム系の関与は否定されている(Table 1)。一方、一般に変異タンパク質の分解に関与するものと考えられているproteasome系の阻害剤を用いた場合にも、変異ZAP-70タンパク質の分解は抑制されなかったことから、未知のタンパク分解系が関与している可能性が示唆された。

細胞内におけるタンパク質の安定性は、タンパク質の高次構造を維持する各種のシャペロン分子の存在に依存するものと考えられている。実際我々は、M572L変異体の細胞内における安定性は、キナーゼ特異的シャペロンとして知られるCdc37を共存させることで著しく上昇することを見出している²⁾。一方で、Cdc37はP80Q変異体の安定性にはほとんど影響を与えなかった²⁾。そこで、P80Qの安定性を規定する分子を検索すべく、野生型ZAP-70タンパク質とP80Q変異体に結合する分子の比較を行った(図4)。分子量66 kDaの分子(p66)が、P80Q変異体に特異的に結合していることが明らかとなった。一方、130 kDaの分子(p130)は野生型

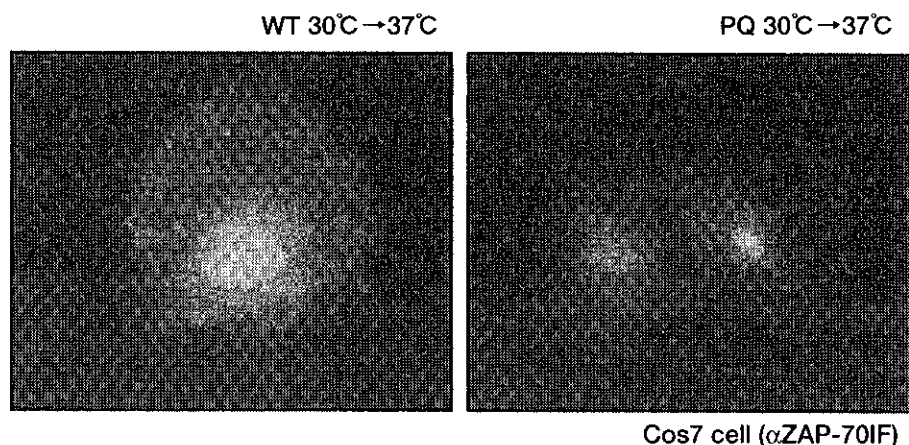


図 3 : 変異ZAP-70タンパク質の細胞内局在。COS7細胞を30°Cで培養し、野生型ならびにP80Q変異体をそれぞれ一過性に発現させた後、37°Cに温度をシフトし1時間後に抗ZAP-70抗体を用いた間接蛍光抗体法によりZAP-70タンパク質の局在を評価した。

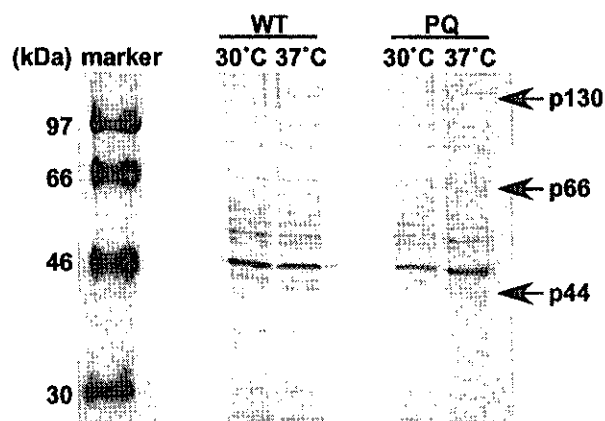


図 4 : ZAP-70結合タンパク質の検出。P116を親株に野生型ならびにP80Q変異体を安定に発現する株をそれぞれ樹立した。30°Cで培養した細胞ならびに30°Cで培養後、37°Cにシフトして1時間後の細胞から、それぞれ抽出液を調製し、抗Myc-tag抗体のアフィニティーカラムによってZAP-70タンパク質を回収し、そこに結合しているタンパク質を銀染色によって検出した。

ZAP-70タンパク質への結合は見られるもののP80Q変異体への結合は認められなかった。さらに30°CではZAP-70への結合が見られないにも関わらず、37°Cにおいて結合が見られる分子量44 kDaの分子(p44)の存在も明らかとなった。今後、これら結合タンパク質の同定を進めることで、変異タンパク質の安定化・不安定化を制御する分子機序が明らかになるものと期待される。

【文献】

- 1) Katamura, K., Tai, G., Tachibana, T., Yamabe, H., Ohmori, K., Mayumi, M., Matsuda, S., Koyasu, S., and Furusho, K. Existence of activated and memory CD4+ T cells in peripheral blood and their skin infiltration in CD8 deficiency. *Clin Exp Immunol.* (1999) 115, 124-30.
- 2) Matsuda, S., Suzuki-Fujimoto, T., Minowa, A., Ueno, H., Katamura, K., and Koyasu, S. Temperature-sensitive ZAP70 mutants degrading through a proteasome-independent pathway. Restoration of a kinase domain mutant by Cdc37. *J Biol Chem.* (1999) 274, 34515-8.
- 3) Ueno, H., Matsuda, S., Katamura, K., Mayumi, M., and Koyasu, S. ZAP-70 is required for calcium mobilization but is dispensable for mitogen-activated protein kinase (MAPK) superfamily activation induced via CD2 in human T cells. *Eur J Immunol.* (2000) 30, 78-86.

Degradation mechanism(s) of mutant ZAP-70 proteins causing immunodeficiency

Satoshi Matsuda, Shigeo Koyasu

Department of Microbiology and Immunology, Keio University School of Medicine

We have identified two novel missense mutations (P80Q and M572L) in the *zap-70* genes of a CD8-deficiency patient. Both mutations cause degradation of ZAP-70 protein in a temperature-sensitive manner through a novel proteolytic pathway. Conformation change at the restriction temperature may trigger the degradation of mutant ZAP-70 proteins. We further demonstrate the existence of cellular proteins specifically associated with mutant ZAP-70 proteins, suggesting that mutant proteins are stabilized in vivo with the aid of an associated protein(s).

ヒト臍帯血CD25陽性CD4陽性T細胞の解析

野村 明彦 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野)
高畑 靖 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野)
高田 英俊 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野)
原 寿郎 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野)

我々はこれまで臍帯血T細胞には在胎週数と逆相関してCD25陽性細胞が多いことを報告した。一方、CD25陽性CD4陽性T細胞の一部は抑制T細胞として知られている。今回、臍帯血CD25陽性CD4陽性T細胞についてサイトカイン、co-stimulatory molecule の mRNA、T cell receptor excision circles (TRECs) の定量的PCRおよびT細胞に対する抑制能を検討した。臍帯血CD25陽性CD4陽性T細胞に特徴的なサイトカイン発現はなかったが、CD25陰性細胞に比べ有意にCTLA-4の発現が高く、成人末梢血CD4陽性T細胞に比べ有意にTRECの発現が高かった。また、臍帯血、成人末梢血CD25陽性CD4陽性T細胞はともに高濃度IL-2での増殖反応と他のT細胞に対する抑制能を有していた。以上のことから臍帯血CD25陽性CD4陽性T細胞は抑制能を有する細胞であり、その発生は胸腺分化の段階ですでに亜集団として存在していると考えられた。

【はじめに】

CD25分子はIL-2R α 鎖であり、T細胞の活性化マーカーとして知られている。近年、CD25⁺CD4⁺T細胞には、CTLA-4を介してT細胞に抑制的に働き自己免疫寛容に関与する細胞が存在することがヒトやマウスで報告されてきた [1, 2]。一方、これまで我々は臍帯血T細胞の表面マーカー解析を行う過程で、臍帯血T細胞のほとんどは抗原による活性化を受けないナイーブT細胞であるにも関わらず、CD25⁺の割合が高く、さらに在胎週数と逆相関することを明らかにした。臍帯血におけるCD25⁺CD4⁺T細胞の特徴については十分に明らかでないことから、今回、この臍帯血リンパ球亜群の抑制的機能を中心に検討した。

【対象と方法】

1. 対象

CD25抗原の発現は在胎23~40週の臍帯血143例について行った。また、その他の解析は妊娠、分娩歴に異常のない正期産臍帯血 (cord blood: CB) および健常成人末梢血 (peripheral blood: PB) を用

いた。

2. 表面マーカー解析

臍帯血143例について、FITC標識抗ヒトCD3抗体、PE標識抗ヒトCD25抗体、PC5標識抗ヒトCD4およびCD8抗体を用いた全血法による3 color analysisを行った。さらに、正期産臍帯血および健常成人末梢血について、FITC標識抗ヒトCD25抗体、PC5標識抗ヒトCD4抗体にPE標識抗ヒトHLA-DR、CD45RA、CD45ROまたはCD62L抗体を組み合わせ、CD25⁺CD4⁺T細胞上の表面抗原解析を同様にを行った。

3. CD25⁺CD4⁺T細胞およびCD25⁻CD4⁺T細胞の単離

臍帯血および健常成人末梢血より単核球 (MNC) を分離後、FITC標識抗ヒトCD4抗体、PE標識抗ヒトCD25抗体で標識し、cell sorter (EPICS ALTRA) によりCD25⁺CD4⁺T細胞とCD25⁻CD4⁺T細胞を回収した。純度は、CD25⁺CD4⁺T細胞が90%以上、CD25⁻CD4⁺T細胞が95%以上であった。

4. 増殖能および増殖抑制能

CD25⁺およびCD25⁻CD4⁺ T細胞 (2×10⁵/ml) を irradiated (30Gy) MNC (4×10⁵/ml), phytohemagglutinin (PHA) (2.5 μg/ml) もしくはPHA+IL-2 (1000U/ml) 存在下に培養した。さらにCD25⁻CD4⁺ T細胞 (2×10⁵/ml) をPHA刺激下に一定のCD25⁻CD4⁺ T細胞を加え培養した。それぞれ3日間培養後18時間の [³H]-thymidine取り込みにて増殖能を測定した。

5. 定量PCR

単離したCD25⁺およびCD25⁻CD4⁺ T細胞からcDNAを作製し, ABI PRISM7700を用いてサイトカイン (TGF-β, IL-10, IFN-γ およびIL-4) と co-stimulatory molecules (CTLA-4およびCD28) の mRNAの定量を行なった。また, genomic DNAを抽出後, T cell receptor excision circles (TRECs) の発現を β-actinをinternal controlとし同様に定量した。

【結果】

1. 在胎週数と臍帯血CD25⁺ T細胞の関係

臍帯血中のCD25⁺ T細胞の割合は在胎週数と逆相関し, 早期産児臍帯血ほどCD25⁺ T細胞の割合

が増加していた。さらにT細胞に占めるCD25⁺CD4⁺ T細胞およびCD25⁺CD8⁺ T細胞の割合も同様であった (図1)。

2. 臍帯血CD25⁺CD4⁺ T細胞の表面抗原の発現

臍帯血CD25⁺CD4⁺ T細胞における活性化マーカーやCD45抗原の発現を比較した。臍帯血CD25⁺CD4⁺ T細胞は, 成人末梢血CD25⁺CD4⁺ T細胞に比べ, CD45RAおよびCD38の陽性率が高く, HLA-DRが低値であった (表)。

3. 臍帯血CD25⁺CD4⁺ T細胞のサイトカインおよび co-stimulatory moleculesの発現

臍帯血および成人末梢血それぞれのCD25⁺CD4⁺ T細胞とCD25⁻CD4⁺ T細胞でのサイトカインおよび co-stimulatory moleculesのmRNAの発現を定量PCR法にて調べた。サイトカインmRNAの解析では, IL-4, IFN-γの発現は見られず (データ未掲載), IL-10は成人末梢血CD25⁺CD4⁺ T細胞のみで検出された (図2A)。また, TGF-βは各細胞において同レベルに発現しており, 臍帯血T細胞に特異的ではなかった (図2B)。Co-stimulatory moleculesにお

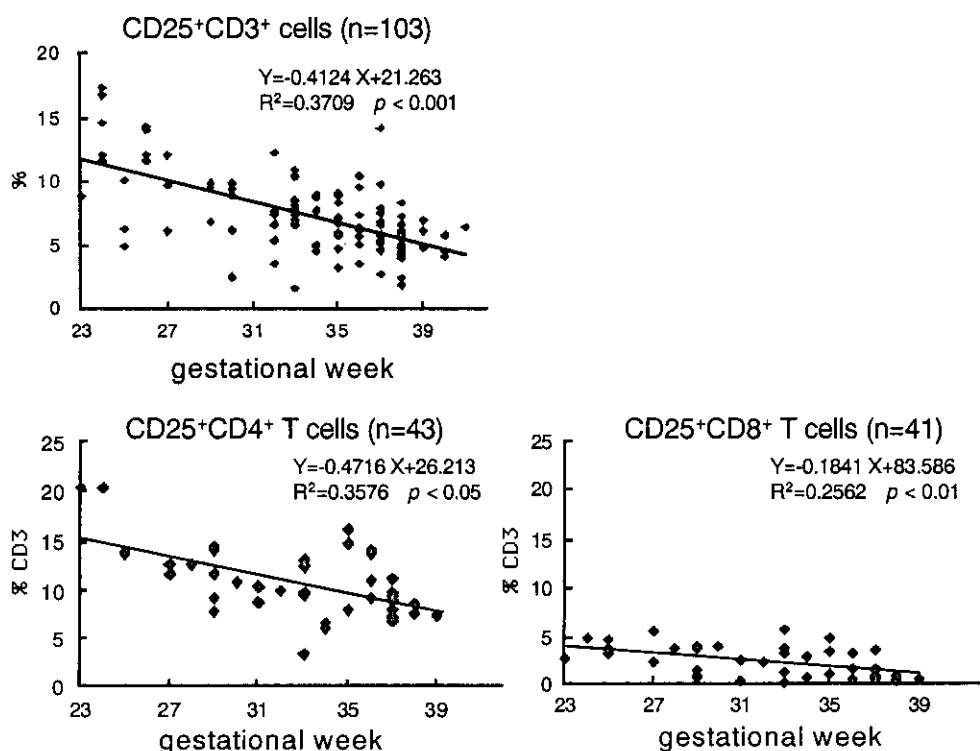


図1. 在胎週数と臍帯血CD25⁺ T細胞の関係 (Spearman's rank sum test)

表 臍帯血CD25⁺CD4⁺T細胞の表面抗原の発現

	% gate CD25 ⁺ CD4 ⁺ T cell (mean ± SD)			% gate CD25 ⁻ CD4 ⁺ T cell (mean ± SD)		
	PB (n=5)	CB (n=5)	<i>p</i>	PB (n=5)	CB (n=5)	<i>p</i>
CD45RO	89.0 ± 11.2	19.8 ± 13.1	<0.001	20.0 ± 13.1	8.3 ± 9.3	n.s.
CD45RA	3.9 ± 3.5	74.7 ± 10.9	<0.001	50.0 ± 10.8	89.9 ± 6.3	<0.001
HLA-DR	34.3 ± 15.1	7.3 ± 7.2	<0.05	6.6 ± 4.9	0.7 ± 0.4	0.055
CD62L	82.9 ± 4.6	90.7 ± 6.8	n.s.	81.5 ± 9.5	94.1 ± 8.5	n.s.
CD38	31.2 ± 9.1	86.9 ± 9.6	<0.001	67.1 ± 16.9	98.8 ± 1.3	<0.05
CD28	97.8 ± 3.8	94.1 ± 8.1	n.s.	89.7 ± 10.3	98.1 ± 0.9	n.s.
CD71	17.8 ± 6.4	4.8 ± 4.9	<0.05	1.4 ± 1.3	2.1 ± 3.1	n.s.
CD122	5.2 ± 4.1	11.0 ± 9.8	n.s.	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.3	n.s.

n.s.: not significant

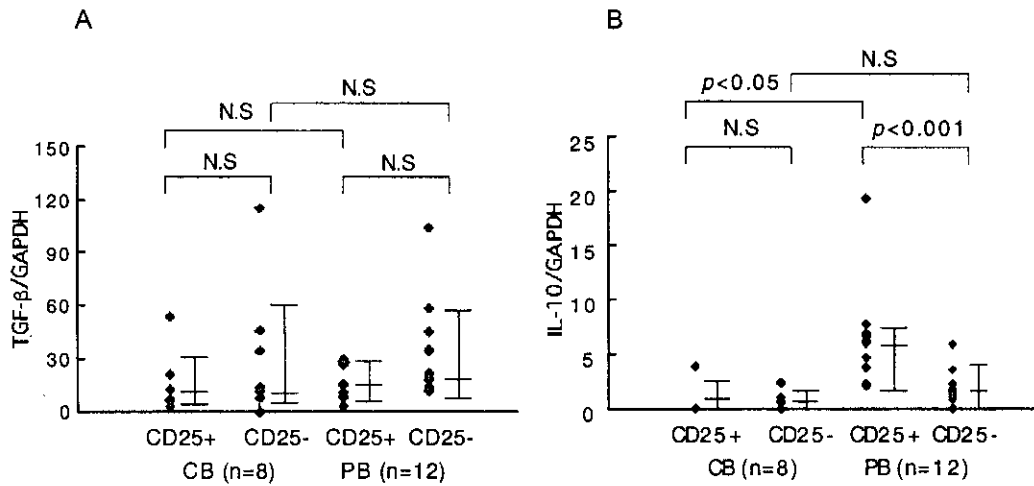


図2. サイトカインの定量PCR解析
AおよびBはそれぞれIL-10とTGF-βを示す。

いては、CD28の発現は各細胞間で差を認めなかったが(図3B)、CTLA-4は臍帯血および成人末梢血のCD25⁺CD4⁺T細胞で同レベルに発現を認め、各群のCD25⁻CD4⁺T細胞よりも有意に高発現していた(図3A)。

4. 臍帯血CD25⁺CD4⁺T細胞におけるTRECsの発現

臍帯血で見られるCD25⁺CD4⁺T細胞が末梢での活性化したT細胞であるかについてTRECsの発現によって検討した。臍帯血CD25⁺CD4⁺T細胞のTRECsは、成人末梢血CD25⁺CD4⁺T細胞に比べ有意に高く、臍帯血CD25⁺CD4⁺T細胞と同レベルであった(図4)。

5. 臍帯血CD25⁺CD4⁺T細胞における増殖能および抑制能

臍帯血CD25⁺CD4⁺T細胞の増殖能をAPC存在下でのPHA単独もしくはPHA+高濃度IL-2刺激により測定した。臍帯血および成人末梢血のCD25⁺CD4⁺T細胞は、PHA単独刺激での増殖はほとんど認められず、高濃度IL-2の添加によってCD25⁻CD4⁺T細胞と同レベルの増殖がみられた(図5)。

CD25⁺CD4⁺T細胞の抑制能をPHA刺激によるCD25⁻CD4⁺T細胞の増殖反応に対して検討した。臍帯血においては、CD25⁺CD4⁺T細胞数に依存してCD25⁻CD4⁺T細胞の増殖能の低下がみられた。また、成人末梢血でも同様の傾向がみられたが有意差は得られなかった(図6)。

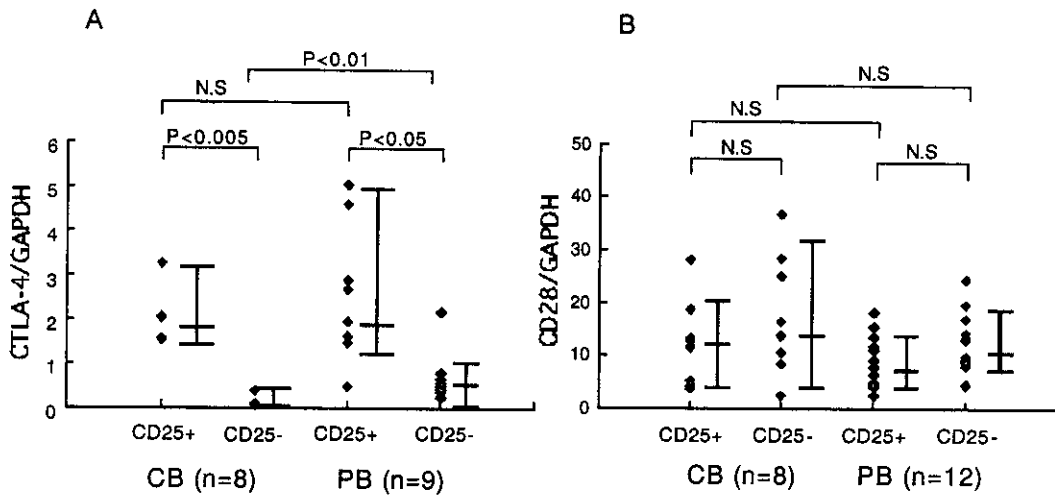


図 3. Co-stimulatory moleculesの定量PCR解析
AおよびBはそれぞれCTLA-4とCD28を示す。

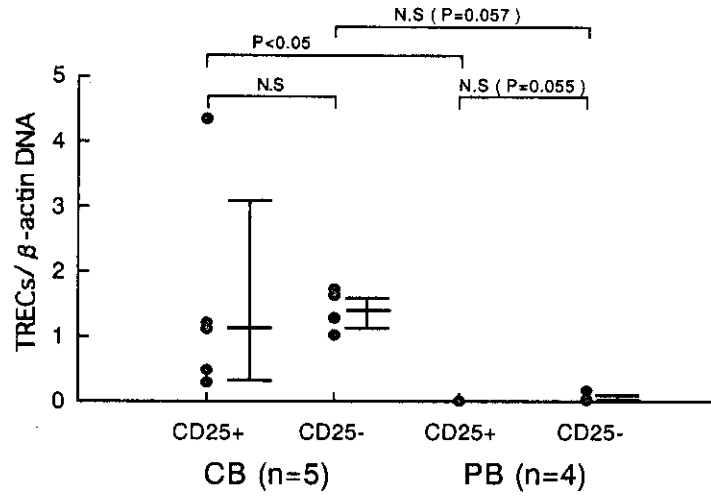


図 4. TRECsの定量PCR解析

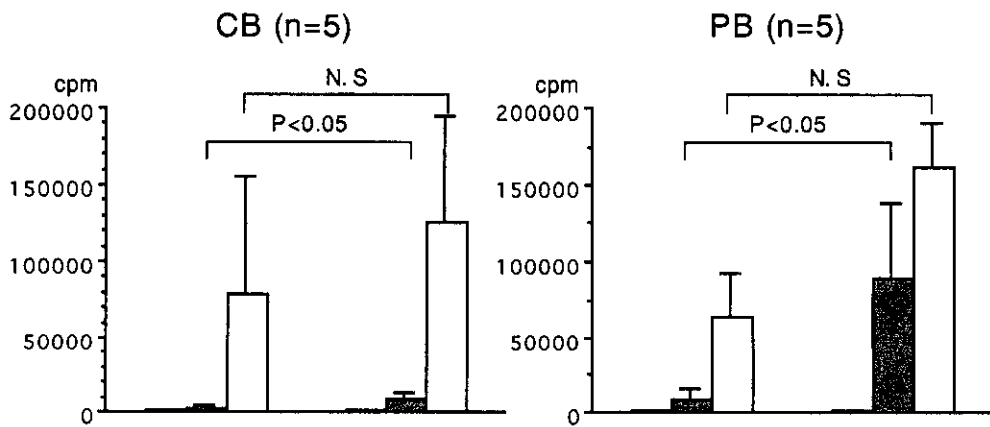


図 5. PHAおよびIL-2刺激による増殖能
■はPHAによる刺激, □はPHA+IL-2 (1000U/ml) による刺激を示す。

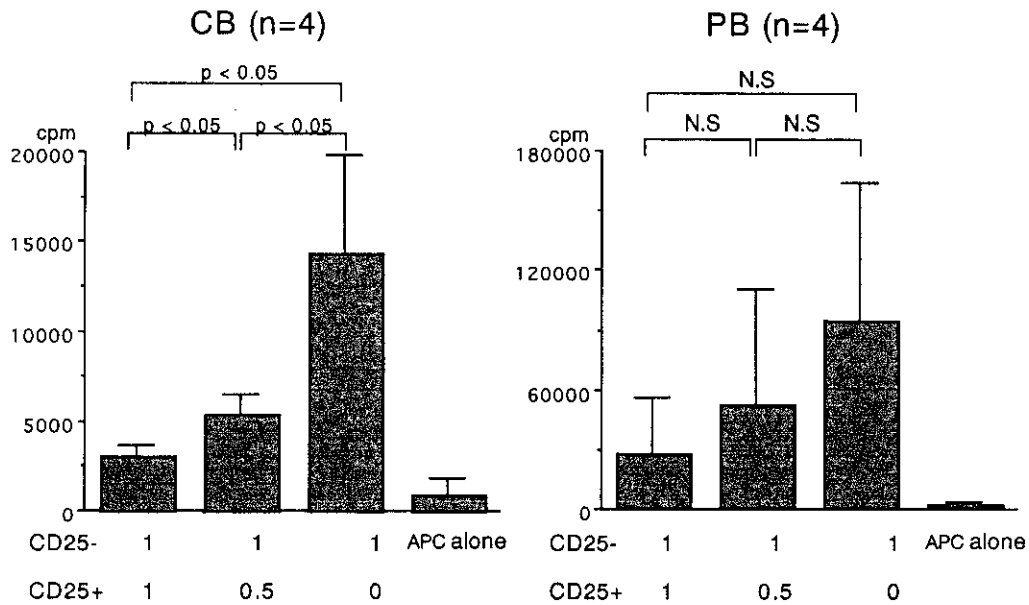


図 6. CD25⁺CD4⁺ T細胞によるPHA刺激CD25⁺CD4⁺ T細胞増殖の抑制

【考察】

抑制性CD25⁺CD4⁺ T細胞はantigen-presenting cells (APC) の存在下にCTLA-4 依存的に他のT細胞の増殖能やサイトカイン産生能などを抑制することが知られている [3]。今回の解析において、臍帯血CD25⁺CD4⁺ T細胞は 1) CD25⁺CD4⁺ T細胞の増殖に対する抑制, 2) PHA単独刺激に対するanergy, 2) 高濃度IL-2に対する増殖反応, 3) CTLA-4の高発現などこれまでの報告と同様な抑制性CD25⁺CD4⁺ T細胞の特徴を有していた。一方、成人末梢血CD25⁺CD4⁺ T細胞の抑制能は十分ではなかったが、Baecherらは末梢血において抑制能を有する細胞はCD25^{high}CD4⁺ T細胞であると報告している [4]。成人末梢血CD25⁺CD4⁺ T細胞の抑制能が十分には認められなかった理由として、CD25^{high}CD4⁺ T細胞に限定しての解析ではなかった点や成人末梢血では個体のばらつきが大きい点が影響していたと思われる。サイトカインの解析ではIL-10のみが成人末梢血CD25⁺CD4⁺ T細胞に高発現していたが、これまでCD25⁺CD4⁺ T細胞の抑制に液性因子は関与していないとする報告が多いことからIL-10の意義は不明である。また、membrane TGF- β を介して抑制が行われるとの報告 [5] もあるが、今回の検討ではTGF- β の発現に各細胞間での違いは見られ

なかった。臍帯血CD25⁺CD4⁺ T細胞は抑制能を有していたにも関わらず、成人末梢血CD25⁺CD4⁺ T細胞やこれまでの報告とは異なるphenotypeであった。CD62L抗原の発現に差はなかったが、臍帯血CD25⁺CD4⁺ T細胞にはCD45ROの発現がほとんどなく、成人末梢血やこれまでの報告と最も異なる点であった。さらに臍帯血CD25⁺CD4⁺ T細胞はHLA-DRやCD71などの活性化マーカーの発現がほとんどなく、CD38抗原が高発現しており、未熟なナイーブT細胞のphenotypeを呈していた。さらにTREGsが高発現していたことも胸腺分化したナイーブT細胞であることを示唆している。この様に臍帯血CD25⁺CD4⁺ T細胞は抑制能を有するナイーブT細胞亜集団であり、すでに胸腺分化の段階で発生していると思われる。しかし、早期産児臍帯血においてさらに増加しているCD25⁺CD4⁺ T細胞についてのその機能的特徴や生理的意義については不明である。

【文献】

1. Sakaguchi S, Sakaguchi N, et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various

- autoimmune diseases. *J Immunol.* 1995;155(3):1151-64.
2. Stephens LA, Mottet C, Mason D, Powrie F. Human CD4(+)CD25(+) thymocytes and peripheral T cells have immune suppressive activity in vitro. *Eur J Immunol.* 2001;31(4):1247-54.
 3. Sakaguchi S. Policing the regulators. *Nat. Immunol.* 2001;2(4):283-4.
 4. Baecher-Allan C, Brown JA, et al. CD4⁺CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol.* 2001;167(3):1245-53.
 5. Yamagiwa S, Gray JD, et al. A role for TGF-beta in the generation and expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells from human peripheral blood. *J Immunol.* 2001;166(12):7282-9.

Functional analysis of CD25⁺CD4⁺ T cells in human cord blood

Akihiko Nomura, Yasushi Takahata, Hidetoshi Takada, Toshiro Hara

Department of Pediatrics, Graduate School of Medicine Sciences, Kyushu University

It is known that a part of CD25⁺CD4⁺ T cells are capable of immune suppressive activity. Previously, we found that the proportion of CD25⁺T cells in cord blood (CB) inversely correlated with the gestational age. In this study, we examined gene expressions of cytokines, co-stimulatory molecules and T cell receptor excision circles (TRECs) by quantitative real-time PCR in CD25⁺CD4⁺ T cells of CB, and their regulatory effects on other T cells. Although the expression levels of cytokine gene were no difference between CD25⁺CD4⁺ T cells in CB and adult peripheral blood (APB), the expression levels of CTLA-4 in CD25⁺CD4⁺ T cells were higher than in CD25⁻CD4⁺ T cells. Furthermore, the levels of TRECs in CD25⁺CD4⁺ T cells of CB were higher than those in CD25⁻CD4⁺ T cells of APB. CD25⁺CD4⁺ T cells in both CB and APB had the ability to proliferate after the stimulation with high dose of IL-2, and to suppress the proliferation of PHA-stimulated T cells. Our results suggested that CD25⁺CD4⁺ T cells in CB, which were capable of immune suppressive activity, appeared through the process of T cell-development in thymus.

ATM, BLM ダブルノックアウト細胞の作成とその特徴

近 藤 直 実 (岐阜大学医学部小児科)

深 尾 敏 幸 (岐阜大学医学部小児科)

Philip Chen (岐阜大学医学部小児科)

金 子 英 雄 (岐阜大学医学部小児科)

Martin F Lavin

(Cancer and Cell Biology, Queensland Institute of Medical Research)

Ataxia-telangiectasiaおよびBloom症候群は共に高発癌, 早老症, 不妊, DNA不安定性, 染色体異常などを伴う先天性免疫不全症である。その原因蛋白ATMとBLMが物理的に相互作用し, ATMはBLMをリン酸化する。今回ニワトリB細胞由来で高頻度に相同組み換えをおこすDT40細胞を用いてATM, BLM ダブルノックアウト細胞を作成し, その表現型をATMおよびBLM単独ノックアウト細胞と比較検討した。最終的にはATM ノックアウト細胞にBLM ノックアウトコンストラクトを導入することにより, ダブルノックアウト細胞を得た。このダブルノックアウト細胞においては, ATM, BLM両mRNAの発現がないことをRT-PCRにより確認した。

【はじめに】

Ataxia-telangiectasia (A-T) およびBloom症候群は共に高発癌, 早老症, 不妊, DNA不安定性, 染色体異常などを伴う先天性免疫不全症である。A-Tの原因蛋白ATMはセリン, スレオニン蛋白キナーゼであり, p53, c-abl, nibrinなどを燐酸化して, 細胞周期コントロールなどを行う重要な蛋白で, 一方Bloom症候群の原因蛋白BLMはDNAヘリカーゼの1つでDNA修復に重要な蛋白である。われわれはこれまでにヒトにおいてATMとBLMが物理的に相互作用すること, そしてATMがBLMをリン酸化することを明らかにしてきた。今回さらに両蛋白の相互作用を明らかにする目的で, ニワトリB細胞由来で高頻度に相同組み換えをおこすDT40細胞を用いてATM, BLM ダブルノックアウト細胞を作成した。その表現型をATMおよびBLM単独ノックアウト細胞との比較検討について報告する。

【対象と方法】

1) 細胞およびknockout construct: ATM knockout DT40細胞およびATM knockout constructsは金沢大

学がん研究所細胞制御の山本健一先生より供与を受け, BLM knockout DT40細胞およびBLM knockout constructsはAGENE研究所の松本武久先生より供与をうけた。

DT40細胞はRPMI1640+10%FCS+1%chicken serumの培地を用い, 5% CO₂, 37度もしくは39.5度にて培養し, 細胞のcharacterizationは39.5度にて行った。
2) トランスフェクションと薬剤耐性スクリーニング: トランスフェクションは 1×10^7 細胞に30mgのlinealized knockout constructをGene Pulserを用いて550V, 25mFの条件にて行った。約12-18時間後に薬剤耐性スクリーニングを96穴プレートを用いて開始し, 7日-14日後に肉眼で視れる大きさまで増殖したコロニーをピックアップし, 24穴プレートに移した。

3) homologous recombinationを起こしたクローンの同定: それぞれの薬剤耐性クローンからゲノムDNAを抽出し, サザンブロット解析を行った。

4) RT-PCR: U18 (Normal), ATM^{-/-}, BLM^{-/-}, Double knockout DT40細胞からTotal RNAを抽出し, 5mgRNAをATM, BLM特異的プライマーとoligo dTプライマ

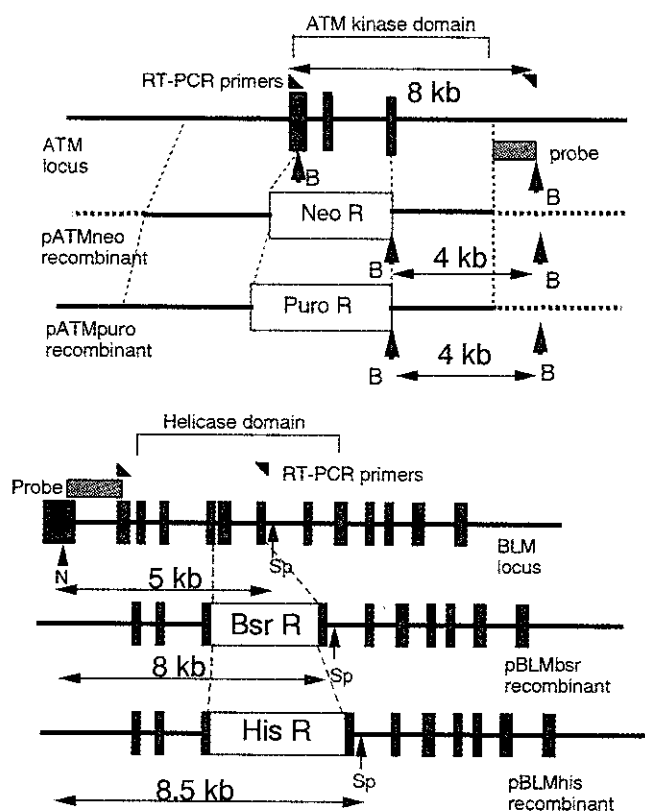
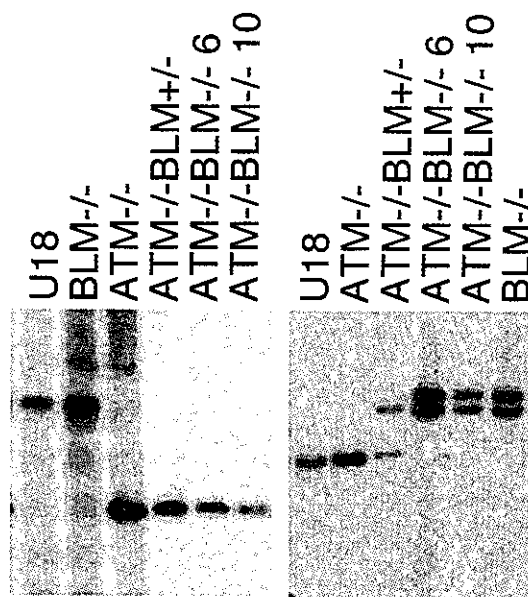


図 1

ATM probe

BLM probe



ーの混合プライマーを用いてcDNA合成を行い、ATM, BLM, β -actin 断片を増幅した。

5) 倍加時間：細胞を 1×10^4 /mlとし、12時間ごとに48時間まで生細胞数をトリパンブルー染色にてカウントした。

6) 放射線感受性およびUV感受性： 2×10^4 /mlの細胞濃度で、0.5 Gyの γ 線照射、もしくは0-7.5 J/m²のUVCを照射後48時間培養し、生細胞数をトリパンブルー染色にてカウントした。

【結果】

1) ダブルノックアウト細胞の作成

10^7 個のATM^{-/-}細胞にpBLMbsr (Blasticidin耐性BLM knockout construct)を導入し、計19個の薬剤耐性クローンを得た。サザンプロットの結果そのうち4クローンがBLM^{+/-}のヘテロクローンであった。そのうちのBSR21クローンをを用いてpBLMhis (Histidinol耐性BLM knockout construct)を導入し、約30個のクローンを得、そのうち17個のクローンについてサザンプロットを行ったところ、5個のBLM^{-/-}パターンのクローンが得られた。サザンプ

ロットをU18 (正常), ATM^{-/-}, BLM^{-/-}とともにATM, BLMプローブでおこなったサザンプロットの結果を図1に示す。ATM^{-/-}BLM^{-/-}6および10はともにATM^{-/-}, BLM^{-/-}のパターンを示した。次に両遺伝子がknockoutされていることをmRNA発現にて確認した。図2に示すようにATM^{-/-}, double knockout 6,10では正常, BLM^{-/-}で検出されたATMcDNA断片は増幅されず, BLM^{-/-}, double knockout 6,10ではBLM cDNA断片は増幅されず, β アクチンは同程度にすべての細胞で増幅された。以上からdouble knockout 6, 10は両遺伝子がknockoutされていることが確認できた。

2) ダブルノックアウト細胞とシングルノックアウト細胞の比較

ATM^{-/-}は正常細胞より増殖が遅いが, BLM^{-/-}は更に増殖が遅く, ATM^{-/-}から作成したダブルノックアウト細胞 6,10はほぼBLM^{-/-}と同様の増殖を示した。 γ 放射線感受性についてはATM^{-/-}は著しい放射線感受性を示し, BLM^{-/-}は正常とATM^{-/-}の中間の感受性を示し, ダブルノックアウト細胞 6,10はほぼATM^{-/-}と同様に著しい感受性を示した。

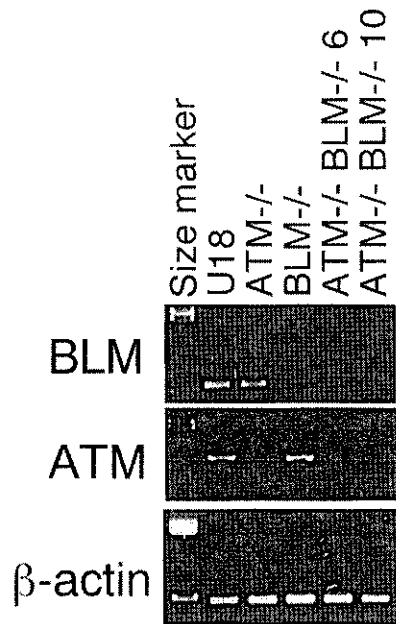


図 2

UVCに対する感受性では、ATM^{-/-}はほぼ正常と同じ程度の感受性であったが、BLM^{-/-}、ダブルノックアウト細胞 6,10は同程度に著しい感受性を示した。

【考察】

我々はこれまでにATMとBLMが結合し、ATMがBLMをリン酸化すること、BLMの存在もATMが正常に機能するのに必要であるということをもトリンパ球細胞系において明らかにしてきた。そこでATM、BLMの関連について更に明らかにするためには、両者の欠損しているダブルノックアウト細胞、マウスの表現型をそれぞれの単一ノックアウト細胞、マウスと比較してみるというのが、有力な手段となる。

これまでにATM、BLMそれぞれのノックアウトマウスが報告されている。残念ながらBLMの完全なノックアウトマウスは胎生期に致死となることが知られており、ダブルノックアウトマウスの作成は困難と考えられていた。そこで、高頻度相同組み換えをおこし、細胞レベルでの遺伝子ノックアウトによく用いられているDT40細胞系に注目した。既にATM^{-/-}、BLM^{-/-}が別々の研究所で作成されており、これらの細胞、ノックアウトconstructを利用することが可能であった。

まだ細胞については解析の途中であるが、シングルノックアウト細胞とダブルノックアウト細胞を比較すると興味深い結果が得られた。ATM^{-/-}の細胞増殖は正常細胞より遅かったが、BLM^{-/-}はそれに比較しても著しく遅く、ATM^{-/-}から作成したダブルノックアウト細胞もBLM^{-/-}と同等に遅く、BLM遺伝子の欠損が細胞増殖に著しい影響を与えることが明らかとなった。ダブルノックアウト細胞の放射線、UVに対する感受性はそれぞれATM^{-/-}、BLM^{-/-}の感受性とほぼ等しく、両者が欠損することで更に感受性が高くなったり、逆に低くなることはなかった。しかし、Bloom症候群では一般にγ線に対する感受性は正常と考えられていたが、今回のDT40細胞の解析、またBloom症候群のリンパ球細胞系を用いた解析においてもATM^{-/-}と正常の中間の感受性を示したことは興味深い。今後さらにダブルノックアウト細胞の性質について調べていく予定である。

【謝辞】

本研究は日豪科学共同研究（代表 近藤直実）および上原記念生命科学財団のリサーチフェロウシップ（深尾敏幸）によった。金沢大学がん研究所細胞制御の山本健一先生、AGENE研究所の松本武久先生、京都大学医学研究科 放射線遺伝学の武田俊一先生にサンプル、御助言をいただき、ここに深謝いたします。

【参考文献】

- 1) Takao N, et al. Disruption of ATM in p53-null cells causes multiple functional abnormalities in cellular response to ionizing radiation. *Oncogene* 18:7002-7009, 1999
- 2) Imamura O et al. Bloom helicase is involved in DNA surveillance in early S phase in vertebrate cells. *Oncogene* 20: 1143-1151, 2001

Establishment and characterization of ATM and BLM double knockout DT40 cell lines.

Naomi Kondo, Toshiyuki Fukao, Philip Chen, Hideo Kaneko, Martin F Lavin

Department of Pediatrics, Gifu University School of Medicine, Cancer and Cell Biology, Queensland Institute of Medical Research.

Ataxia-telangiectasia and Bloom syndrome are inherited immunodeficiency syndromes with high incidence of cancer, progeria, infertility, DNA instability, and chromosomal aberration.

ATM and BLM responsible for these disorders, respectively, interact physically and ATM phosphorylates BLM. In this study, we made ATM and BLM doubleknockout cells from DT40 cells which have a high incidence of homologous recombination and characterized double knockout cells comparing with ATM and BLM single knockout cells. We finally got the knockout cells from ATM knockout cells. Double kockout cells express neither ATM mRNA nor BLM mRNA in RT-PCR analysis.
